

Vysoká škola Báňská – Technická univerzita Ostrava

Hornicko – geologická fakulta

Institut environmentálního inženýrství

Biodegradace organických látek

Biodegradation of Organic Substances

Diplomová práce

Autor:

Bc. Gabriela Černá

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jaroslav Závada, Ph.D.

Ostrava 2011

VŠB - Technická univerzita Ostrava
Hornicko-geologická fakulta
Institut environmentálního inženýrství

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Gabriela Černá**
Studijní program: N2102 Nerostné suroviny
Studijní obor: 3904T022 Zpracování a zneškodňování odpadů
Téma: **Biodegradace organických látek**
Biodegradation of Organic Substances

Zásady pro vypracování:

1. Úvod
2. Cíl práce
3. Vliv toxických organických látek na životní prostředí
4. Vliv mikroorganismů na rozklad organických látek
5. Experimentální část
6. Vyhodnocení výsledků analýz
7. Závěr

Seznam doporučené odborné literatury:

ČERNÝ, A. Parazitické houby. 1.vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989.
ISBN 80-209-0090-X.

BAIER, J. Ochrana dřeva. 3.vyd. Praha: Grada, 1996. ISBN 80-7169-275-1.


SVOBODA JIŘÍ A KOL.. Organická chemie I, 1. vydání [online]. VŠCHT v Praze, ISBN 978-80-7080-561-9, 2005

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.


Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jaroslav Závada, Ph.D.**

Datum zadání: 31.10.2010

Datum odevzdání: 30.04.2011


prof. Ing. Vojtech Dirner, CSc.
vedoucí institutu




prof. Ing. Vladimír Slivka, CSc., dr.h.c.
děkan fakulty

Prohlášení

Celou diplomovou práci včetně příloh, jsem vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

Byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. - autorský zákon, zejména § 35 – využití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a využití díla školního a § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB-TUO) má právo nevýdělečně, ke své vnitřní potřebě, diplomovou práci užít (§ 35 odst. 3).

Souhlasím s tím, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB-TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci, obsažené v Záznamu o závěrečné práci, umístěném v příloze mé diplomové práce, budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.

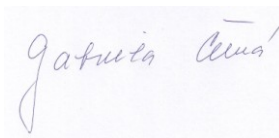
Souhlasím s tím, že diplomová práce je licencována pod Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported licencí. Pro zobrazení kopie této licence, je možno navštívit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu o komerční využití z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.

Bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu komerčnímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).

V Ostravě dne 29. 4. 2011

Bc. Gabriela Černá



Abstract

The theme of this thesis is examining soil samples taken from the contaminated area Lahos Hulváky and analysis.

After studying history in terms of rehabilitation as the most suitable alternative method for selected degradation that is irreversible destructive processes that cause major changes in the structure of substances and materials. Of the various types of degradation (chemical, physical, photodegradation, etc.) and with respect to the investigated soil samples were selected biodegradation, which is a special case of degradation, which involves the decomposition of substances under the action of living organisms.

Bacterial Leaching was then performed in the presence of bacteria taken from an oil source Korňanského (Slovakia).

Keywords: bacterial leaching, biodegradation, Lahos Hulváky, Korňanský petroleum source

Anotace

Tématem diplomové práce je zkoumání vzorků půdy získané z kontaminovaného území oblasti Lahos Hulváky a jejich analýza.

Po prostudování historie z hlediska sanací byla jako nejlépe vyhovující alternativa vybrána metoda degradace, která je nevratným rozkladným procesem, jež způsobuje zásadní změny struktury látek a materiálu. Z různých druhů degradace (chemických, fyzikálních, fotodegradace aj.) a se zřetelem na zkoumané vzorky půdy byla zvolena biodegradace, což je speciální případ degradace, při níž dochází k rozkladu látek za působení živých mikroorganismů.

Bakteriální loužení bylo pak provedeno za přítomnosti bakterií odebraných z Korňanského ropného pramene (Slovensko).

Klíčová slova: bakteriální loužení, Biodegradace, Lahos Hulváky, Korňanský ropný pramen

Poděkování:

Ráda bych touto cestou srdečně poděkovala svému vedoucímu diplomové práce za trpělivost, ochotu a pomoc při řešení nemalých pracovních problémů. Chci také poděkovat za spolupráci pracovníkům laboratoří VŠB-Technické univerzity v Ostravě na institutu environmentálního inženýrství.

Seznam použitých zkratk

AAS – atomová absorpční spektrometrie

BTEX – benzen, toluen, ethylbenzen, xylén

CPIT – centrum pokročilých inovačních technologií

ČSN – česká technická norma

EN – evropské normy

ISO – mezinárodní organizace pro normalizaci

DOC – rozpuštěný organický uhlík

FID – plamenový ionizační detektor

GC – Gas chromatography

GLC – plynová rozdělovací chromatografie

PAU, PAHs – polycyklické aromatické uhlovodíky

PCB – polychlorované bifenyly

TN – celkový vázaný dusík

TOC – celkový organický vázaný uhlík

VOC - těkavé organické sloučeniny (Volatile Organic Compounds)

NEL – nepolární extrahované látky

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce.....	2
3. Znečištěná lokalita Lahos Ostrava	3
3.1 Vliv toxických látek na životní prostředí v okolí lokality Lahos	4
3.2 Šíření kontaminace v nenasycované zóně	5
4. Ropný pramen Korňa, výběr mikroorganismů	6
5. Organické látky a jejich toxické vlastnosti.....	7
5.1 Vlastnosti a toxikologie organických látek.....	8
5.1.1 Alifatické uhlovodíky.....	8
5.1.2 Aromatické uhlovodíky	10
5.1.3 Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	13
5.1.4 Fenoly	14
5.1.5 Polychlorované bifenylly (PCB)	15
6. Mikroorganismy degradující organické látky	17
6.1 Rozdělení mikroorganismů.....	18
6.2 Biodegradace ropných uhlovodíků	19
6.3 Biodegradace polychlorovaných bifenylů	20
7. Metodiky analýz vybraných látek	21
7.1. Atomová absorpční spektrometrie	21
7.2. Metodika stanovení organického vázaného uhlíku (TOC)	21
7.3 Metodika stanovení dusíku	22
7.3.1 Metoda oxidační mineralizace.....	22
7.3.2 Metoda oxidační mineralizace.....	23
7.3.3 Metoda Kjeldahla	23
7.4. Metodika chromatografie.....	23
7.4.1 Plynová chromatografie FID.....	23
8. Experimentální část	26
8.1 Odběr vzorků a příprava vodného výluhu	26
8.2 Příprava vodného výluhu	27
8.2.1 Stanovení množství sušiny.....	27

8.2.2 Výpočet množství kontaminované půdy k provedení výluhu.....	28
8.2.3 Výpočet množství vody pro přípravu výluhem	28
8.3 Práce s vodným výluhem obou vzorků	29
8.4 Analýza anorganických látek.....	31
8.5. Biodegradace organických látek ve výluhu	32
8.5.1 Analýza TOC a DOC	33
8.6. Plynová chromatografie	33
8.6.1. Plynová chromatografie s FID.	34
9. Závěr	36
10. Použitá literatura	37
11. Seznam obrázků	41
12. Seznam tabulek	42
13. Seznam grafů.....	42

1. Úvod

Se vzrůstající průmyslovou činností vzniká spousta látek, které mají nepříznivý vliv na životní prostředí a zdraví lidí. Ve světě, a nejen v České republice, existuje mnoho lokalit, které jsou dlouhodobou ekologickou zátěží, a kde se nachází ve velkých koncentracích škodlivé látky. Škodlivé látky se dostávají do prostředí důsledkem lidských aktivit (antropogenní vlivy) a člověk se je snaží co nejúčinnějším způsobem zneškodnit.

Škodlivé látky, jejichž jméno jsou polutanty, mohou být přírodní, syntetické látky anebo prvky, které působením přírodního procesu začaly být škodlivé. Mají buď organický nebo anorganický původ. Svými nadlimitními hodnotami znečišťují ovzduší, ale také i půdu a vodu. Pro likvidaci polutantů existuje celá řada sanačních postupů užívajících se v závislosti na míře a druhu kontaminované plochy. Jedny z nich jsou technologické metody, které můžeme rozdělit na fyzikálně-chemické, termické a elektrokinetické a na biologické.

V celém sanačním procesu je nejdůležitější zvolení nejúčinnějšího a ekonomicky nevýhodnějšího nápravného opatření.

2. Cíl práce

V této diplomové práci je cílem ověření možností použití bakterií při biodegradaci organických látek z výluhu.



Obrázek 1: Bakterie z ropného pramene Korňa [1]

3. Znečištěná lokalita Lahos Ostrava

Známostou lokalitou v našem městě, která nese známky silného znečištění, je pozemek bývalé chemické továrny, která byla založena již více jak před sto lety.

Prudký nárůst průmyslové výroby v druhé polovině 19. století nesl sebou rozvoj koksárenství i v oblasti ostravské uhelné pánve. Dehet vzniklý při koksování se prvotně používal k energetickým účelům. Postupem času se upouštělo od jeho spalování a přešlo se na jeho průmyslové zužitkování. Dokud byla jeho produkce nízká, stačilo jej odvážet do specializovaných továren v Rakousku nebo Německu. Při větším množství dehtu už byl jeho vývoz nevýhodný. Proto byla postavena továrna na zpracování černouhelného dehtu v tehdejší obvodu Moravské Ostravy, části Zábřehu nad Odrou. Zakladatel továrny byl rakouský průmyslník Julius Rütgers, který vlastnil závody na zpracování koksárenského dehtu a benzolu také např. v Německu a Rakousku. Výstavba závodu byla zahájena 12. července 1892 a rok poté, 10. ledna, začal její provoz. Po majiteli byla pojmenována na továrnu Rütgers.

V letech 1894-1896 nastalo velké rozšíření závodu. Byla postavena destilovna olejů se čtyřmi destilačními kotly, větší kotelná, chladírna pro krystalizaci naftalenového oleje. Začala výstavba naftalenového lisu ke zpracování naftalenového krystalu. Jednotka na zpracování antracenového oleje byla doplněna odstředivkou k oddělování antracenového krystalu od filtrovaného oleje. Postavila se zámečnická dílna. Celková plocha závodu zaujímala 9,5ha.

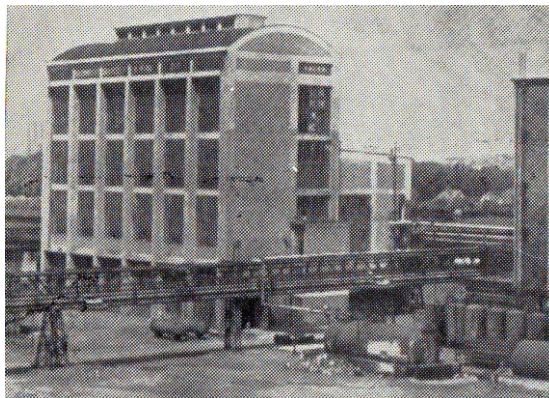
V dalších letech byla vybudována tovární jednotka na zpracování surového benzolu. Na počátku disponovala třemi destilačními kotly. Tím se vyřešil problém s vedlejšími produkty při koksování černého uhlí, které se mohly dále zpracovávat. Výroba čistého benzenu, toluenu, xylenu, rozpouštěcího benzolu započala v roce 1899. Toto datum je významné, protože se poprvé u nás začal používat tento způsob výroby poprvé.

Ze závodu Julia Rütgerse se v roce 1921 stala komanditní společnost. Společnost se sloučila s firmou Luttnar v Moravské Ostravě. Výrobní program se rozšířil vedle dehtárenské výroby i o výrobu střešní lepenky, mazacích průmyslových tuků, dehtovaného linolea aj. Zrušili se výroby surového dehtu a benzolu.

V roce 1938 vypukl v továrně velký požár, při kterém muselo zasahovat 28 požárních jednotek.

Během druhé světové války byl závod poškozen bombardováním i válečnými operacemi. K osvobození závodu došlo 30.4.1945. Výrobní, které během války byly plně využívány, musely být po ukončení války důkladně renovovány a upraveny. V poměrně krátké době se podařilo uvést továrnu opět do provozu.

K přejmenování závodu došlo v roce 1950. Název dostaly podle umučeného hrdiny, redaktora Rudého práva, Eduarda Urxe. Továrna prošla velkými reorganizacemi. Výrobní program závodu byl zúžen a specializován na zpracování černouhelného dehtu a benzolu s výrobnou sazí.



Obrázek 2: Budova destilace surového benzolu z roku 1955 [2]

V dubnu roku 1964 došlo k výbuchu chemičky. Explozí se dostalo do půdy a ovzduší velké množství škodlivin. Zanedlouho po výbuchu byl vedle továrny vysázen sanační pás listnatých stromů.[1]

V roce 1990 se Urxovy závody přeměnily na akciovou společnost s názvem DEZA. Po deseti letech závod DEZA ukončil svou výrobu. Byly zbourány všechny budovy a sanovány pozemky pod budovami, což je zhruba 1/3 areálu.[2]

Na základě výroby, která probíhala na pozemku Lahos Hulváky můžeme předpokládat, že se zde vyskytují ve zvýšených koncentracích látky jako je benzen, toluen, PAU, xylen, benzol, fenol aj. Tyto látky budou probrány podrobněji v následující kapitole.

3.1 Vliv toxických látek na životní prostředí v okolí lokality Lahos

Exploze, ke které v dané lokalitě došlo, zamořila celou oblast. Znečištěný areál je ještě dnes tikající bombou pro Ostravany. Půda je zamořena až do hloubky 20m a toxicita jednotlivých organických sloučenin tu překračuje mezní limity. Podzemní vody v areálu nemohou být využívány pro velkou kontaminaci. Znečištění může dosáhnout až ke zdroji pitné vody Ostravanů-Nové vsi. Existuje sice hydraulická bariéra, která ochraňuje zdroje pitné vody, ale změnami vlastníků zůstal Černý Petr v rukou Ostravských vodáren a kanalizací, což je řešení provizorní.

V letech 2001-2002 proběhla v areálu částečná dekontaminace metodou biodegradace on-situ. Vyčistilo se jí 17 900t kontaminované zeminy. Dvě třetiny pozemků

jsou stále kontaminovány. Organické látky, které se zde vyskytují ve větších koncentracích jsou fenoly, PAU a ropné látky.[2]

3.2 Šíření kontaminace v nesaturované zóně

Pro další posouzení, týkajícího se šíření kontaminantů je nezbytná znalost stávajícího rozsahu kontaminace a charakteristika parametrů nesaturované zóny a polutantů.

Nesaturovaná zóna tvoří rozhraní mezi komunikačním prostředím a podzemní vodou. Při výskytu lehce těkavých látek zde může docházet k šíření kontaminantů v plynné fázi, a to buď na povrchu nebo do podzemních prostor. Chování polutantů v nesaturované zóně je velice důležité k posouzení rizika ohrožení podzemních vod. V zóně dochází k transportu polutantů vlivem:

- proudění vody
- hydrodynamickou disperzi

U polutantů rovněž dochází k sorpci na pevné částice horninového prostředí a tím ke změnám koncentrace znečišťujících látek vlivem mikrobiálních, chemických a dalších reakcí.

Velice důležité informace pro posouzení šíření v nesaturované zóně jsou doba, za kterou projde znečištění nesaturovanou zónou k hladině podzemních vod a množství koncentrace migrujících polutantů. Způsob, kterým lze zjistit posouzení migrujících polutantů z nesaturované zóny do podzemí promýváním srážkové vody, lze provést vodním výluhem z půdy. [3]

Předpoklad, že je v nesaturované zóně námi zmiňované lokality kontaminace organických látek (fenoly, PAU, ropné uhlovodíky aj.) i po deseti letech, kdy byla průmyslová výroba ukončena, velký. Provedením vodního výluhu z půdy dané lokality stanovíme míru znečištění v současné době.

Dnes známe mnoho druhů, které jsou vhodné k odbourávání organicky znečištěných lokalit. Plísňě způsobující bílou hnilobu jsou například jedny z nich. [4] Na základě získaných výsledků se provede naočkování mikroorganismů, které jsou vhodnými odbouravači organických polutantů.

4. Ropný pramen Korňa, výběr mikroorganismů

Z velké škály mikroorganismů byly zvoleny ropné mikroorganismy, které degradují organické látky vyskytující se přímo v ropě. A z tohoto důvodu jsou i vhodné pro biodegradaci předpokládaných látek vyskytujících se v lokalitě Lahos Hulváky.

V chráněné krajinné oblasti Kysuce na území obce Korňa vyvěrá Korňanský ropný pramen. Ojedinelý přírodní úkaz doprovázený výrony zápalného metanu, který dostal v roce 1984 ohodnocení přírodní památka.

Vznik ropy byl v mořském prostředí dříve než vznikly horniny, ve kterých se dnes nachází. Do těchto vrstev se dostala po zlomech a puklinách a v důsledku Alpínského vrásnění.

Lehká parařinová ropa, která obsahuje velký obsah olejů a malé množství síry, aromatických uhlovodíků a alifaticko-smolných látek. Jedná se o velmi kvalitní ropu, která se využívá k léčebným účelům. [5]



Obrázek 3: Korňanský ropný pramen [3]

5. Organické látky a jejich toxické vlastnosti

Termín organické látky vznikl v 19. století. Jsou to látky, jejichž atomy jsou v molekulách propojovány chemickou (kovalentní vazbou). Velká část organické chemie se zabývá látkami, které obsahují vazby C-H, C-C nebo oběma typy. Zvláštní postavení mezi prvky zaujímá uhlík. Uhlíkaté sloučeniny převyšují mnohonásobně sloučeniny jiných prvků. Jedinou výjimku tvoří vodík.

Dnes je známo přes 15 milionů látek a každým rokem několik set tisíc přibývá. Uhlíkaté sloučeniny jsou tvořeny řetězcem. Podle něj je můžeme rozdělit na uhlovodíky a odvozené sloučeniny uhlovodíků. Primárním zdrojem uhlovodíků je uhlí, ropa a zemní plyn. [6]

Uhlí vznikalo v bažinných ekosystémech jezerních pánví, říčních delt nebo na územích při okrajích pevnin, z pravěkých rostlin, jako byly např. plavuně, přesličky atd. Ty za působení sluneční energie vytvářely ze vzduchu, vody a minerálních látek uhlovodíky. Po odumření klesaly pod hladinu bažiny, kde za nepřítomnosti kyslíku nedocházelo k jejich rozložení běžnými biologickými procesy. [7]

Výchozími látkami jsou celulóza a lignit. Uhlí se skládá z vysokomolekulárních sloučenin, jejichž struktura není přesně známá. Zejména jej tvoří uhlík a dále vodík, kyslík, dusík a síra. Obsahuje také množství minerálních látek, které po spálení tvoří popel. Při přeměně hnědého uhlí na černé dochází k tvorbě methanu. [6]

Ropa je hořlavá kapalina, která je získávána z podzemních nalezišť. Existuje celá řada teorií o vzniku ropy, proto není její původ dosud bezezbytku vysvětlen. Na rozdíl od uhlí ropa v podzemí obvykle migrovala působením tlaků a horotvorných procesů, proto se nachází ve větších vzdálenostech od místa vzniku. Při přesunu ropy od místa vzniku mohlo docházet k adsorpci některých látek, těžší látky se mohly štěpit působením velkých teplot, katalytickým účinkem některých hornin nebo radioaktivním zářením. Plyny a lehčí látky mohly vytékat.

Organická teorie vzniku ropy vychází z předpokladu, že ropa vznikla z organismů žijících ve slaných a smíšených vodách. Organismy (mořské trávy, řasy, rostlinný a živočišný plankton, mikrop plankton a bakterie) se po odumření hromadily na dně zejména vnitrozemních moří a lagun. Docházelo k mísení s anorganickými látkami, které se zde usazovaly, podléhaly hnilobě a vytvářely tzv. sapropel. [8]

Zemní plyn je směs plynů. Existuje řada teorií o jeho vzniku. Jelikož se velice často vyskytuje spolu s ropou nebo uhlím, mnozí odborníci se přiklánějí k teorii, že vzniká postupným uvolňováním při vzniku ropy a uhlí jako důsledek postupného rozkladu organického materiálu. [9]

Zemní plyn je obvykle složen ze 75 % methanu a 15 % ethanu, zbytek je tvořen alkany, oxidem uhličitým, dusíkem a jinými plyny. [6]

5.1 Vlastnosti a toxikologie organických látek

Toxikologie je nauka o škodlivých a nežádoucích účincích látek na živé organismy a ekosystémy. Zabývá se mechanismy účinků látek a analýzou škodlivin ve složkách životního prostředí a biologickém materiálu. Objasňuje výsledky, prevenci i léčbu otrav a způsoby, jak škodlivé účinky látek stanovovat a odhadovat.

Toxikologie se člení na specializované disciplíny (obecnou toxikologii, experimentální, klinickou aj.). Disciplína, která popisuje, shromažďuje a hodnotí toxické vlastnosti konkrétních chemických látek se nazývá speciální.

Způsobů, jak utřídit informace o toxikologických vlastnostech prvků a jejich sloučenin, je velká škála. Vybráno bylo rozdělení na:

- prvky a jejich anorganické sloučeniny
- organické sloučeniny
- organokovové sloučeniny

Organické sloučeniny se dělí podle skupin uhlovodíků a jejich derivátů, dusíkatých heterocyklických sloučenin a sloučenin síry. Toxikologicky zajímavé organické sloučeniny mají poměrně nízkou relativní hmotnost, poměrně vysokou tenzi par a bývají hypofilní. Pomocí znalostí chemické konstituce, znalosti atomů a vazeb, které je spojují, nebo molekulových částí lze odhadnout toxicitu některých organických sloučenin. Nemusí to být ale vždy pravidlem. Existují látky strukturně příbuzné s odlišnými účinky specifického charakteru. [10]

5.1.1 Alifatické uhlovodíky

Alifatické uhlovodíky mají jednoduché vazby tvořené uhlíkem a vodíkem. Rozdělují se na nasycené (alkany), které jsou více toxičtější než nenasycené (alkeny, alkyny).

Alkany nebo-li parafíny mají jednoduché vazby mezi atomy uhlíku, obecný vzorec $C_n H_{2n+2}$.

Alkeny, obecný vzorec je $C_n H_{2n}$ a jejich deriváty nebo-li olefiny, mají dvojnou vazbu a tím méně vodíkových atomů než alkany. [6] Z olefinu jsou připravovány polyethylen a polypropylen. Souhrnně se nazývají polymery, butadien a jeho chlorované deriváty. [10]

Alkiny mají trojnou vazbu a obecný vzorec je $C_n H_{2n-2}$. [6]

Ropa a ropné produkty jsou hlavním zdrojem těchto uhlovodíků, ale jsou také obsaženy v různých rostlinných a živočišných buňkách. [11]

I přes velkou ochranu při manipulaci s ropnými produkty dochází stále k znečišťování životního prostředí. Do ovzduší se dostávají ropné těkavé látky odpařováním ropných produktů. Při těžbě ropy, její dopravě nebo haváriích tankerů, se ropné látky dostávají do půdy a vody.

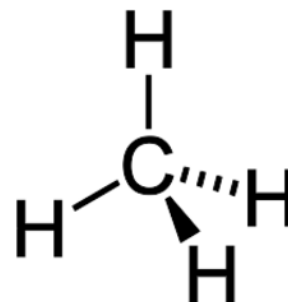
Ve vodě vytváří ropa plovoucí vrstvu a tím zamezuje přísunu kyslíku do vody. V důsledku toho se snižuje tvorba planktonu, který je potravou pro ryby a další mořské živočichy. Živočichové, kteří přijdou do kontaktu s ropou mají poškozené peří nebo kůži a následně může u nich dojít k úhynu.

Havárie, které vznikají na pevnině, jsou velice nebezpečné, jelikož ropné látky mohou proniknout do podzemních vod a dekontaminace trvá dlouhou dobu. [8]

Toxické účinky ropných látek se u člověka projevují kožním onemocněním, dráždivými účinky na dýchací cesty, poruchou krvetvorby, centrálního nervového systému, karcinogenitou. [12]

Methan (CH_4) je za normálního tlaku a teploty bezbarvý plyn bez zápachu. Bod varu má při $-161^\circ C$. V tlakových nádobách se vyskytuje v kapalně formě. Je to látka hořlavá a v určitých koncentracích ve směsi se vzduchem výbušná. Podstatnou část zemního plynu tvoří právě methan, který se používá v domácnostech a průmyslu jako palivo.

V chemickém průmyslu se methan používá při výrobě různých látek např. acetylen, vodík. V přírodě je methan konečným



Obrázek 4: Struktura molekuly methanu [4]

produktem redukce organických látek při biologických pochodech, probíhajících bez přístupu kyslíku. Vyskytuje se při zahňvacích procesech (např. rašeliniště) a je označován jako bahenní plyn.

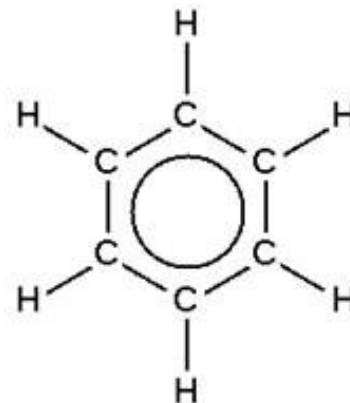
Jako plynná látka proniká pouze do ovzduší a jiné složky životního prostředí jím nejsou ohroženy. Methan přítomný v atmosféře absorbuje infračervené záření na zemském povrchu, a tak nedochází k jeho úniku do vesmíru. Právě proto methan přispívá ke globálnímu oteplování a řadí se mezi skleníkové plyny. Methan je lehčí než vzduch a jeho transport v atmosféře je v podstatě neomezený.

I krátkodobé působení methanu ve vysoké koncentraci na člověka může způsobit jeho udušení z nedostatku kyslíku. [13]

5.1.2 Aromatické uhlovodíky

Jde o závažnou skupinu látek, které mohou být hepatotoxické, neurotoxické, mutagenní i karcinogenní. [10]

Benzen (C_6H_6) v čistém stavu bezbarvá, těkává a hořlavá kapalina charakteristického zápachu. Bod varu přichází při teplotě $80,1\text{ }^{\circ}C$, k tuhnutí dochází při teplotě $5,5\text{ }^{\circ}C$. Rozpustnost ve vodě je velmi nepatrná. Benzen se mísí s alkoholem, chloroformem, diethyletherem, acetonem, kyselinou octovou a tetrachlormethanem. Chemicky je benzen poměrně stabilní a účastní se substitučních a adičních reakcí, při nichž může dojít k rozštěpení benzenového jádra.



Obrázek 5: Struktura molekuly benzenu [4]

Benzen se vyrábí z ropy a využívá se jako nepolární rozpouštědlo barev, cementu, lepidla, odbarvovačů. Je výchozí látkou pro syntézu celé řady chemických látek, jako jsou plasty, pryskyřice, barviva, pesticidy. Průmyslová výroba je největším zdrojem znečištění benzenem (výroba ropných produktů, koksovna uhlí, výroba aromatických uhlovodíků). Dalšími zdroji znečištění je i samotné užívání výrobků, které jej obsahují např. benzín. Dostupnost benzenu je ve třech normalizovaných stupních kvality s měnícím se obsahem toluenu, xylenu a fenolu a obvykle obsahuje sirouhlík, thiofen a naftalen. [14]

Benzen při vdechnutí při koncentraci cca 7g.m^{-3} způsobuje akutní otravy a selhání dýchacího ústrojí. Pokud dojde ke koncentraci kolem 60g.m^{-3} , stává se smrtelná. [6] Ve venkovských oblastech se koncentrace benzenu v ovzduší pohybují od $0,2\text{ }\mu\text{g/m}^3$ a v průmyslových oblastech s vysokou hustotou automobilové dopravy $349\text{ }\mu\text{g/m}^3$. V průběhu tankování pohonných hmot se pohybuje koncentrace až 10 mg/m^3 . [15] U lidí pracujících s benzenem byl zjištěn vysoký nárůst onemocnění leukémií, a proto byl zařazen mezi karcinogeny a teratogeny. [10]

Toluen (CH_3) je čirá bezbarvá kapalina s aromatickým zápachem. Získává se z ropy, lehkého oleje nebo koksových plynů. [10] Bod varu je při $111\text{ }^\circ\text{C}$ a k tání dochází při $-93\text{ }^\circ\text{C}$. Při pokojové teplotě je to látka hořlavá a těkavá. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech a tucích. Patří mezi organické těkavé látky (VOC). [16] Zejména u laků je důležitá ve formě rozpouštědla a ředidla. Řadí se mezi drogy. [10]

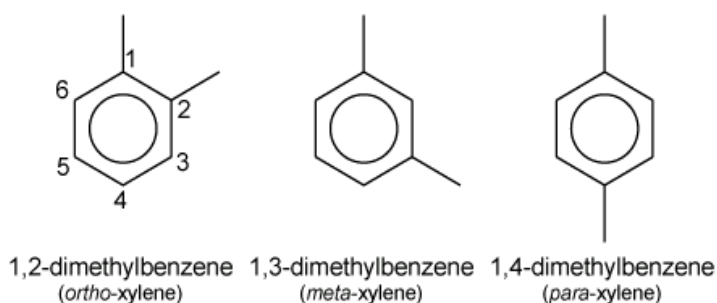


Obrázek 6: Struktura molekuly toluenu [4]

Emise toluenu jsou uvolňovány do vzduchu. V malém množství se může dostávat do vody a půdy ve formě mokré atmosférické depozice. Toluen se v půdě odpařuje a zbývající části se uvolňují do podzemních vod nebo se mikrobiální aktivitou přeměňují na jiné látky. Nemá vlastnosti se kumulovat v potravinových řetězcích. Spoluúčastní se na vzniku fotochemického smogu. [16]

Jeho nebezpečné účinky jsou mnohem menší než u benzenu. Do těla se dostává inhalací, při koncentraci kolem 500 ppm ve vzduchu. Způsobuje pak bolesti hlavy a zvracení. [6] Lidé, kteří tolueň inhalují, se dostávají do stavu opilosti, bezvědomí a může dojít až ke smrtelnému komatu. [10]

Xylen je bezbarvá hořlavá kapalina s aromatickým zápachem vyskytující se ve třech izomerech, které mají různé vlastnosti. Poloha substituentů (skupina – CH_3)



Obrázek 7: Struktury molekul xylenu [4]

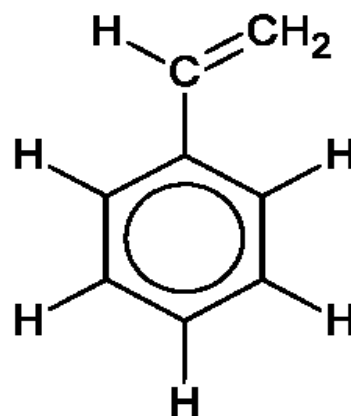
benzenového jádra je rozlišuje na orto- (1,2), meta-(1,3) a para-(1,4) xylen. Technický xylene je směs všech tří izomerů, které se vyskytují v různém poměru. Meta-xylene je obvykle zastoupen s největším podílem (60 – 70%). Obsah technického xyleny se skládá z příměsí ethylbenzenu. Ve směsi se také může vyskytovat menší množství toluenu, trimethylbenzenu, fenolu, thiofenu, pyridinu a nearomatických uhlovodíků. Rozpustnost xyleny ve vodě je nepatrná, nepolární rozpouštědla jej rozpouští velice dobře. Patří mezi těkavé organické látky (VOC).

Směs xylenových isomerů se používá jako přídavek do benzínu pro zvýšení oktanového čísla. Další využití xyleny je v tiskařském a kožedělném průmyslu. Zastává funkci rozpouštědla při výrobě barev, pesticidů, léčiv, lepidel, parfémů, gumy, plastů, polyesterových vláken a filmů. Používá se také jako čisticí a odmašťovací prostředek. Para-xylene slouží k výrobě vláken, filmů a pryskyřic, které se vyskytují v kobercích, tkaninách a oděvech. Orto-xylene je výchozí surovina pro výrobu ftalanhydridu a dalších látek (pro výrobu plastů a pigmentů). Meta-xylene je využíván k výrobě polyesterových pryskyřic a fungicidů.

Těkavost xyleny způsobuje ve vodě nebo půdě jeho rychlé odtékání. Vzhledem k jeho špatné rozpustnosti nedochází k velkému úniku do atmosféry. Společně s jinými těkavými organickými látkami se podílí na tvorbě fotochemického smogu. V půdě i ve vodě může docházet k biodegradačním procesům o-xyleny a p-xyleny. Probíhat mohou za aerobních i anaerobních podmínek. M-xylene je ve stejných podmínkách poměrně perzistentní. V malé míře se xyleny váží na částice půdy a její sedimenty. Izomery xyleny jsou škodlivé pro vodní organismy, pouze malé množství xyleny se akumuluje v organismech. [17]

Při práci v nevětraném prostoru dochází výjimečně k akutní otravě. Projevu se ospalostí, malátností a poruchami spánku. Řadí se mezi inhalační drogy. [10]

Styren (C_8H_8) se v čisté podobě se vyskytuje jako bezbarvá olejovitá tekutina, která se rychle odpařuje. Samostatný má nasládlý pach, ale smíchán s chemickými látkami nepříjemně ostře



Obrázek 8: Struktura molekuly styrenu [4]

zapáchá. Řadí se do skupiny těkavých organických látek (VOC). Styren se sice špatně rozpouští ve vodě, ale v organických rozpouštědlech velice snadno. Vyrábí se synteticky za použití procesu katalycké dehydrogenerace ethylbenzenu. Široké uplatnění nachází v chemické výrobě. Vyrábí se z něj pryž, umělé hmoty, izolace, sklolaminát, potrubí, automobilové součásti, obaly na potraviny, koberce a mnoho dalších. Styren utváří dlouhé řetězce a je využíván k výrobě polystyrenu. Nízké hodnoty substance styrenu se mohou vyskytovat v přírodních produktech (ovoce, zelenina, ořechy nebo maso).

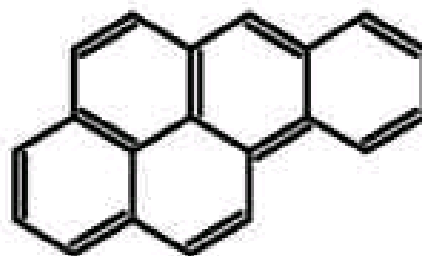
Styren se vyskytuje v ovzduší, vodě a také v půdě. V ovzduší podléhá rychlému rozkladu. Z povrchových vod a půdy se dobře odstraňuje odpařováním, nebo je biodegradován. Nemá tendenci biokumulovat. Největší znečištění styrenem přináší chemická výroba při jeho zpracování, malý podíl na znečištění mají také spalovací procesy. Do prostředí se také styren dostává z odpadních vod chemickými procesy. Stálost styrenu v ovzduší není příliš velká, jeho poločas rozpadu je zpravidla do 12 hodin.

Styren působí na člověka zejména ve vnitřním prostředí. To bývá negativně ovlivněno únikem látky ze stavebních materiálů, spotřebních produktů a tabákového kouře. Do organismu se dostává zejména inhalací, přímým požitím nebo vstřebáním přes kůži. Dlouhodobé působení může negativně ovlivnit nervový systém. [18] Řadí se mezi možné karcinogeny. [10]

5.1.3 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) patří mezi kontaminanty s vysokou odolností proti chemickým, fyzikálním a biologickým účinkům okolí. Jsou schopné dlouhodobě přežívat, cirkulovat a kumulovat se v životním prostředí.

Fyzikálně chemické vlastnosti PAU jsou ovlivňovány molekulovou hmotností. Za normálních podmínek jsou to tuhé látky, bezbarvé, bílé nebo žluté, s relativně vysokým bodem tání i varu. Vše je závislé na počtu benzenových jader a struktuře molekuly. PAU se velice dobře rozpouštějí v alifatických polárních a nepolárních uhlovodících nebo aromatických, jako je benzen, toluen. V životním prostředí mají významnou schopnost se sorbovat na polévaté nebo suspendované malé pevné částice.



Obrázek 9: Struktura molekuly PAU [4]

Při teplotách mezi 500 °C – 750 °C dochází k nedokonalému hoření organického materiálu a vznikají PAU. Nedokonalým spalováním vznikají nestabilní prekurzory PAHs. K nejvýznamnějším zdrojům vzniku PAHs patří antropogenní činnost. Patří tu spalovací procesy fosilních paliv (benzen, petrolej, uhlí, motorová nafta), které se skládají ze dvou kroků pyrolýzy a pyrosyntézy i výroba elektrické a tepelné energie.

PAHs se vyskytují v různých druzích paliv. Některé prochází spalováním bez změny. Jiné, vzniknou z menších molekul nebo se naopak rozloží na menší molekuly. Do životního prostředí se dostávají antropogenním vlivem v důsledku topení uhlím, spalováním lignitu, dřeva, odpadního oleje, mazutu a topného oleje. Významným zdrojem jsou výfukové plyny ze spalovacích a vznětlivých motorů (spalování uhlovodíků). Pneumatiky a vozovky jsou vyráběny z plniva sazí. Při jejich opotřebení dochází také k uvolnění PAHs do ovzduší. Další zdroje jsou výroba koksu, zpracování ropy, uhlí, zpracování a produkování černouhelného dehtu, výroba a zpracování asfaltu, požáry v lese atd.

Neantropogenním vlivem se do životního prostředí dostávají vulkanickou činností, produkcí z některých rostlin, bakterií či řas.

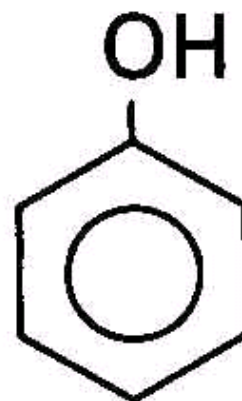
PAU mají mutagenní a karcinogenní účinky. U některých zástupců jsou výrazné, u jiných nebyly prokázány. [19]

Naftalen a antracen jsou méně toxické než je benz(a)pyren nebo methylcholanthren. [10]

5.1.4 Fenoly

Do skupiny fenolů můžeme zařadit nejen látky přirozeně se vyskytující, ale také i sloučeniny vyrobené člověkem. Jedná se o velice rozšířené přírodní látky, které jsou produkovány celou řadou rostlin a živočichů, ale i člověkem. Přirozené deriváty fenolů dávají chuť a barvu mnohým potravinám.

Fenol je bezbarvá nebo bílá krystalická látka se silným, nasládlým, antiseptickým zápachem. Pokud je produkt méně čistý, má obvykle formu narůžovělých krystalů nebo husté viskózní kapaliny. Bod varu této



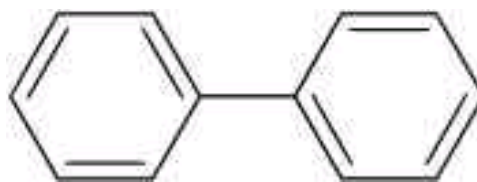
Obrázek 10: Struktura molekuly fenolu [4]

kapaliny je 182 °C a tání 41 °C. Při 75 °C dochází ke vzplanutí. Fenol je rozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech (benzen, aceton, ethanol, sirouhlík, chloroform). [20] Má bakteriostatické účinky, využívá se ke konzervování dřeva. Fenol jako kyselina leptá pokožku, po požití vyvolává prudké bolesti v dutině ústní, v břiše a často končí smrtelně. Otravy fenolem jsou vzácné. Projevují se bolestí hlavy, ochablostí, nechutenstvím a ekzémy.

Kresoly, chlorfenoly a nitrofenoly jsou velice nebezpečné a vysoce toxické látky. Narušují téměř všechny životně důležité funkce. [10]

5.1.5 Polychlorované bifenyly (PCB)

Polychlorované bifenyly jsou látky odvozené od bifenyly. Bifenyl se získává pyrolýzou benzenu nebo působením kovů na halogenbenzeny. Lze jej nitrovat, sulfovat, halogenovat.



Obrázek 11: Struktura molekuly PCB [4]

Polychlorované bifenyly jsou směsí látek podobných vlastností. Známe existenci 209 druhů. Podle chlorace jsou bezbarvé nebo žluté barvy, olejovité, amorfní, netěkavé, nehořlavé. Při teplotách do 1000 °C prakticky nerozpustné ve vodě. Rozpouštějí se v organických rozpouštědlech. Mají chemickou, teplotní a biologickou stabilitu.

Používají se jako nehořlavé, elektroizolační a hydraulické kapaliny, transformátorové oleje, plastifikátory a stabilizátory nátěrových hmot, změkčovadla pryží, laků a plastů, jako přísady tiskařských barev, plniva pesticidů, mazací kapaliny ve strojírenství apod. [6]

V padesátých letech bylo vypouštěno tisíce těchto látek do životního prostředí. Toxicita je závislá na stupni chlorace bifenylového jádra a pozici substituovaných chlórů. Směsi vícechlorovaných kongenerů a směsi obsahující kongenery substituované v pozici meta a para byly nejvíce toxické. [10] Vyskytují se v ovzduší společně s pesticidy a jinými polotěkavými látkami jako pára nebo tuhé částice. V životním prostředí se díky své stabilitě hromadí v biosféře a cirkulují v prostředí s vodou. Uvolňují se spalováním nejrůznějších odpadů při teplotách okolo 700 °C, kdy může dojít ke vzniku ultrajedů. Velké nebezpečí představují požáry elektrické instalace, izolátorů a transformátorů. [6]

PCB mohou vstupovat do těla především orálně, kontaminovanou potravou. Ryby, ptáci a hospodářská zvířata mohou být kontaminováni příjmem PCB. V potravě mohou být kontaminováni také přímo obalem. Zde může dojít k migraci PCB. Koncentrace PCB jsou v játrech, tukových tkáních a mateřském mléce. Množství látky v jednotlivých orgánech je závislá na obsahu tuku, kromě mozku. PCB způsobují snížení porodní váhy novorozenců u těhotných žen a neurologické poruchy u dětí. Chronické inhalační expozice ovlivňují dýchací ústrojí, trávicí trakt. Kůže a oči. Mají také karcinogenní účinky. [21]

6. Mikroorganismy degradující organické látky

Degradace je nevratný rozkladný proces, který způsobuje zásadní změny struktury látek a materiálů.

Biodegradace je proces, ve kterém přirozené nebo naočkované mikroorganismy např. houby, bakterie atd. degradují organické kontaminanty nacházející se v půdě nebo podzemní vodě. V aerobních podmínkách mikroorganismy přemění mnohé organické kontaminanty na oxid uhličitý, vodu a biomasu. V anaerobních podmínkách se kontaminanty nakonec přemění na metan, omezené množství oxidu uhličitého a stopová množství plynného vodíku. Některé kontaminanty mohou být degradovány na meziprodukty, které vykazují stejné nebo více nebezpečné vlastnosti než původní organická látka. [4]

Základním krokem při zkoumání sloučenin kontaminujících životní prostředí je určení jejich biodegradability. Ta se provádí standardními testy, které jsou založeny na schopnosti či neschopnosti aktivovaného kalu odbourávat tyto látky. Aktivovaný kal je směsná kultura mikroorganismů aktivovaných růstem v přítomnosti kontaminantů. Sloučeniny lze odbourat:

- pomocí běžného aktivního kalu
- kalu přizpůsobeného k odbourání daných polutantů
- sloučeniny jsou interní vůči oběma vlivům

Proto jsou rozděleny:

- těžce odbouratelné
- odbouratelné po adaptaci kalu
- neodbouratelné

Biodegradabilita je ovlivněna toxicitou přítomných sloučenin, jejich koncentrací, obsahem živin v prostředí a fyziologickým postavením buněk.

Organické látky, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenylly a další, se řadí do skupiny těžko degradovatelných látek. V současné době výsledky různých laboratoří ukazují, že lze biologickou cestou degradovat látky, o kterých se předpokládalo, že jsou intaktní vůči ekosystému. Organické látky, které mají přírodní nebo syntetický původ bývají těžko degradovatelné. Jejich hlavním znakem je, že odolávají mineralizaci v běžných odpadních technologiích. [11]

6.1 Rozdělení mikroorganismů

Mikroorganismy rozdělujeme do dvou rozsáhlých taxonomických skupin, označovaných jako eukaryotní a prokaryotní organismy. Do první skupiny eukaryotních mikroorganismů řadíme kvasinky, houby, včetně nižších hub tzv. mikromycet neboli plísni. Druhá skupina prokaryotních mikroorganismů je tvořena bakteriemi, archabakteriemi a sinicemi. Disimilace organických látek může probíhat buď za nepřítomnosti nebo přítomnosti molekulového kyslíku. Vývojově starší jsou procesy anaerobní, při nichž mikroorganismy získávají menší množství energie, než při aerobní disimilaci. U velké škály sloučenin je možné využívat oba typy metabolismu, ale některé z nich, např. chlorované sloučeniny, odolávají většině aerobním mikroorganismům.

Bakterie patří mezi mikroorganismy disponující biodegradačním potenciálem.

Anaerobních bakterií je velice málo. Většinou se jedná o mikroorganismy podílející se na biodegradacích vysoce chlorovaných sloučenin. Například rody:

Desulfomonile, Clostridium, Desulfitobacterium

Aerobní bakterií je poněkud více než anaerobních. Například rody:

Pseudomonas, Acinetobacter, Corynebacterium, Rhodococcus, Alcaligenes, Achromobacter, Arthrobacter, Nocardia, Bacillus

Plísně a kvasinky na kontaminovaných lokalitách se méně vyskytují. Mezi jejich nejvýznamnější zástupce patří, například rody:

Candida, Rhodotorula, Sporobolomyces, Trichoderma, Penicillium, Aspergillus [22]

Mikroorganismy hrají v přírodě i životě člověka velkou roli. Jsou to hlavní činitelé ovlivňující tvorbu a zachování životního prostředí na naší planetě. [23] Samostatný výskyt mikroorganismů v přírodě není příliš obvyklý. Žijí v různých konsorciích, ve kterých spolu vzájemně spolupracují nebo soupeří. Součinné vztahy jednotlivých mikroorganismů se posilují těsným kontaktem. Ten je přirozeně dán mikroorganismům rostoucím v agregátech nebo biofilmech. Tvorba biofilmů je zcela běžný jev. Ve vodním prostředí lze vidět mikrobiální osídlení na ponořených kamenech. V půdě utváří společenstva mikroorganismů

biofilm tím, že se vážou na povrch zrnitých částic. Bakterie utvářející biofilm jsou resistantní k vysokým hladinám látek, znečišťujících životní prostředí. [22]

6.2 Biodegradace ropných uhlovodíků

Do skupiny patří alifatické, aromatické a polyaromatické uhlovodíky, které jsou označovány souhrnně jako NEL (nepolární extrahované látky) či PAU.

Alifatické uhlovodíky s nízkou relativní molekulovou hmotností jsou jednodušeji rozložitelné a biodegradace stoupá s jejich rostoucí molekulovou hmotností. Uhlovodíky s 11-16 uhlíků mají nejrychlejší degradaci. Nacházejí se například v motorové naftě. Rozvětvené alifatické uhlovodíky (pristan-3,7,11,15-tetramethylpentadekan, fytan-3,7,11,15-tetramethylhexadekan) jsou vůči biodegradaci resistantní. Látky jako je toluen, benzen, ethylbenzen, xylen (BTEX) mají vysokou rozpustnost ve vodě, což zvyšuje jejich mobilitu v životním prostředí. Uhlovodíky s rostoucím počtem uhlíků jsou méně těkavé, proto se méně vyskytují v plynné fázi. V kapalně formě vytváří na povrchu vody rozsáhlá ropné skvrny. V kontaminované zóně déle přetrvávají uhlovodíky s nižší rozpustností a těkavostí tzn. ty, které mají vyšší relativní molekulovou hmotnost. Rezistence těžších uhlovodíků k biodegradaci je kompenzována větším sklonem k sorpci na horninové prostředí a tím se snížením rizika migrace.

Neúčinnější biodegradace ropných uhlovodíků jsou ty aerobní procesy, kdy je vyžadována přítomnost aerobních bakterií a kyslík v koncentraci nad 0,5 mg/l. Ropné uhlovodíky využívají k degradaci různé druhy mikroorganismů. Při nedostatku kyslíku a dusíku je vhodnější použít houby v podobě plísní a kvasinek, které ropné látky oxidují. [24]

Parafín rozkládá *Penicillium*, které patří mezi vláknité houby. K jeho izolaci dochází pomocí spor nebo vegetativního rostoucího mycelia zejména z půdního prostředí, ze vzduchu a nejrůznějších potravin. Většina druhů tohoto rodu jsou půdní saprofyty, které se podílí na kolonizaci a mineralizaci organických materiálů. *Penicillium* je aerobní a růst probíhá v širokém rozmezí pH a velkém teplotním pásmu. [25]

Olefinickou a parafinickou ropu degraduje *Candida*. [24] Do rodu *Candida* náleží kvasinkové organismy, taxonomicky zařazené mezi houby vřeckovytusné a jsou nozokominalními patogeny. Rod *Candida* se nachází v květních nektarech a na tělech mořských živočichů. [26]

Více jak 200 druhů organismů je schopno uhlovodíky štěpit a využívat je jako zdroj uhlíku a energie. Doposud není znám druh, který by degradoval uhlovodíky komplexně, proto se na biodegradaci podílí celé společenstvo mikroorganismů. [24]



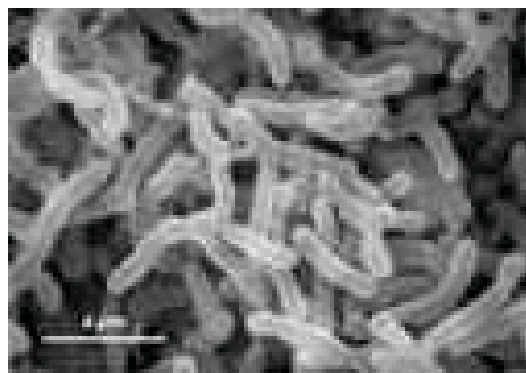
Obrázek 12: *Pseudomonas* [4]

PAU s nižší (2-3 kruhy benzenových jader) molekulovou hmotností mají lepší biologický rozklad, tudíž jsou lépe degradovatelné než PAU s vyšší molekulovou hmotností (4-5 kruhu benzenových jader). PAU dokáží štěpit dřevokazné houby, způsobující bílou hnilobu. [4] [24]

Pseudomonas jednotlivé kmeny a rody bakterií (viz. obr. 12) jsou schopny likvidovat různé typy škodlivin. Likvidace může probíhat za aerobních i anaerobních podmínek. [25]

6.3 Biodegradace polychlorovaných bifenyků

PCB je skupina sloučenin (kongenerů), které obsahují bifenylové jádro. V jádru se nachází 1-10 atomů chlóru. V přírodě, za běžných podmínek, mikroorganismy metabolizují PCB buď aerobně nebo anaerobně. V podmínkách anaerobních podléhají PCB redukční dechloraci za vzniku méně chlorovaných kongenerů. K oxidačnímu ataku dochází aerobně a poté se rozštěpí bifenylové jádro. U PCB, které jsou degradovány bakteriemi dochází ke snížení chlóru (dechlorace), a tak vznikají méně chlorované kongenery (1-4 atomy chlóru). Některé bakteriální kmeny prokazují vyjimečnou schopnost degradovat širší rozsah kongenerů, je to například:



Obrázek 13: *Rhodococcus* [4]

Rhodococcus je velmi různorodá skupina bakterií (viz. obr. 13), která má schopnost rozkládat velké množství organických sloučenin, včetně některých těžko degradovatelných. Toho dosahují díky své schopnosti získávat velkou škálu různých katabolických genů a jejich fyziologicky pevné buněčné stěny. [27]

7. Metodiky analýz vybraných látek

V této kapitole jsou popsány metody stanovení, které byly využity v experimentální části.

7.1. Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je analytická metoda, která se používá ke stanovení obsahu sledovaných prvků. [30] Jde o optickou metodu pracující na principu absorpce světla daných vlnových délek s volnými atomy prvků. Atomový absorpční spektrometr je přístroj, který pracuje na tomto principu. Skládá se ze tří částí :

- zdroj atomizace
- optický systém
- řídicí a vyhodnocovací jednotka

Pro atomizaci analyzovaného prvku se využívají dva základní zdroje. A to plamen a grafitová kyveta (ETA AAS). Pro výzkum prvkového složení materiálu je AAS považována za jednu ze základních metod. [29]

Na Vysoké škole báňské, Centru nanotechnologií je využíván přístroj (UNICAM 969)-atomový absorpční spektrometr s plamenovou atomizací. Dvoupaprskový jednokanálový absorpční spektrometr vybavený mikroprocesorem umožňuje v kapalných vzorcích analyzovat Al, Ag, As, Ba, Be, Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sb, Sn, Si, Ti, Tl, V a Zn na koncentrační úrovni řádově mg/l. Celý atomizační cyklus lze sledovat videokamerou. [30]

7.2. Metodika stanovení organického vázaného uhlíku (TOC)

Celkový obsah organických látek ve vodě lze určovat nepřímo stanovením organického uhlíku. Metody stanovení jsou založeny na oxidaci organických látek na CO₂. Byla vypracována řada postupů, založených na principech organické elementární analýzy. Ty se od sebe liší způsobem oxidace, i způsobem stanovení vzniklého CO₂. Při stanovování organického uhlíku se anorganický uhlík předem ze vzorku odstraní, nebo se musí stanovit zvlášť.

Stanovení celkového, organicky vázaného uhlíku (TOC) je metoda, která spolehlivě určí kvalitu vody.

Koncentrace TOC dává informaci o obsahu organických látek ve vzorku. Stává se celkovým parametrem míry znečištění odpadních a přírodních vod.[31]

Na Institutu environmentálního inženýrství se využívá ke stanovení TOC analyzátor Apollo 9000 fy Tekmar-Dohrmann, který používá vysokoteplotní metodu pro oxidaci vzorku. Proces se skládá ze spalování v pyrolýzní křemenné trubici v přítomnosti platinového katalyzátoru, kde dochází ke vzniku oxidu uhličitého CO₂. Ten je detekován na NDIR detektoru. Teplota při spalování je od 680-800 °C. [32]

K analýze se používá 5 ml vzorku (1 opakování) a syntetický vzduch kvality 5.0 je využíván jako nosný plyn.

7.3 Metodika stanovení dusíku

Stanovení dusíku je jedním ze základních ukazatelů pro odpadní vody. Součet všech forem anorganicky a organicky vázaného dusíku vyjadřuje celkový dusík. Známe tři typy metod, kterými se celkový dusík stanovuje. Na institutu environmentálního inženýrství se k této metodě využívá analyzátor Apollo 9000 s TN modulem.

7.3.1 Metoda oxidační mineralizace

Tato metoda se stanovuje podle normy ČSN EN ISO 11905-1 (75 7527) Část 1- Metoda oxidační mineralizace peroxodisíranem. Specifikuje stanovení sloučenin dusíku přítomných ve vodě především v amoniakální, dusitanové, dusičnanové a organické formě. Využívá se k analýze pitné, podzemní, povrchové a k vyčištění odpadní vody. Analyzovat lze také splaškové, průmyslové odpadní vody v případě, že hodnota TOC vzorku je menší než 40mg/l. Celkový dusík lze ve vzorku stanovit v koncentraci do 5mg/l s mezí detekce 0,02 mg/l.

Sloučeniny dusíku jsou převedeny na dusičnany při použití oxidačního činidla (peroxodisíran draselný) v alkalickém prostředí za vyšší teploty a tlaku v uzavřeném reaktoru. Oxidace se zvyšuje UV zářením nebo katalýzou.

7.3.2 Metoda oxidační mineralizace

Podle normy ČSN EN 12260 (75 7524) Stanovení vázaného dusíku (TNb) po oxidaci na oxidy dusíku. Využívá se ke zjištění sloučenin dusíku ve vodě ve formě amoniakálního, dusitanového, dusičnanového a organicky vázaného. Průběh oxidace je prováděn katalyticky kyslíkem při teplotě cca 1000 °C. Poté následuje oxidace směsi oxidů dusíku ozonem, a tak přeměnou na oxid dusičitý NO_2 , který se stanovuje chemiluminiscenční metodou. Použitelnost této metody je pro všechny druhy vod. Stanovené koncentrační rozpětí celkového dusíku se pohybuje od 1mg/l do 200mg/l. Mez detekce je 0,5 mg/l.

7.3.3 Metoda Kjeldahla

Norma ČSN EN 25663 (75 663) Stanovení dusíku podle Kjeldahla – odměrná metoda po mineralizaci se selenem.

Metoda se specifikuje na stanovení dusíku po tzv. kjeldahlizaci. Kjeldahlovým dusíkem je myšleno stanovení koncentrace organického a amoniakálního dusíku ve vzorku vody určená po mineralizaci. Mineralizace se realizuje kyselinou sírovou za přítomnosti selenu (katalyzátor) ve speciálních Kjeldahlových mineralizačních baňkách. [33]

7.4. Metodika chromatografie

Chromatografie je metoda sloužící k rozdělení a analýze složitých směsí. Uplatnění chromatografie je ve všech vědeckých odvětvích.

Chromatografie umožňuje separaci látek obsažených ve zkoumané směsi, a jejich kvalitativní a kvantitativní analýzu. Chromatografická metoda se zpravidla používá u složitých směsí podobných chemických a fyzikálních vlastností, které jsou obtížně analyzovat.

7.4.1 Plynová chromatografie FID

Plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) je analytická separační metoda sloužící k dělení a stanovení plynů, kapalin i látek pevných s bodem varu do 400 °C. Metoda je založena na rozdělování vzorků mezi dvě fáze:

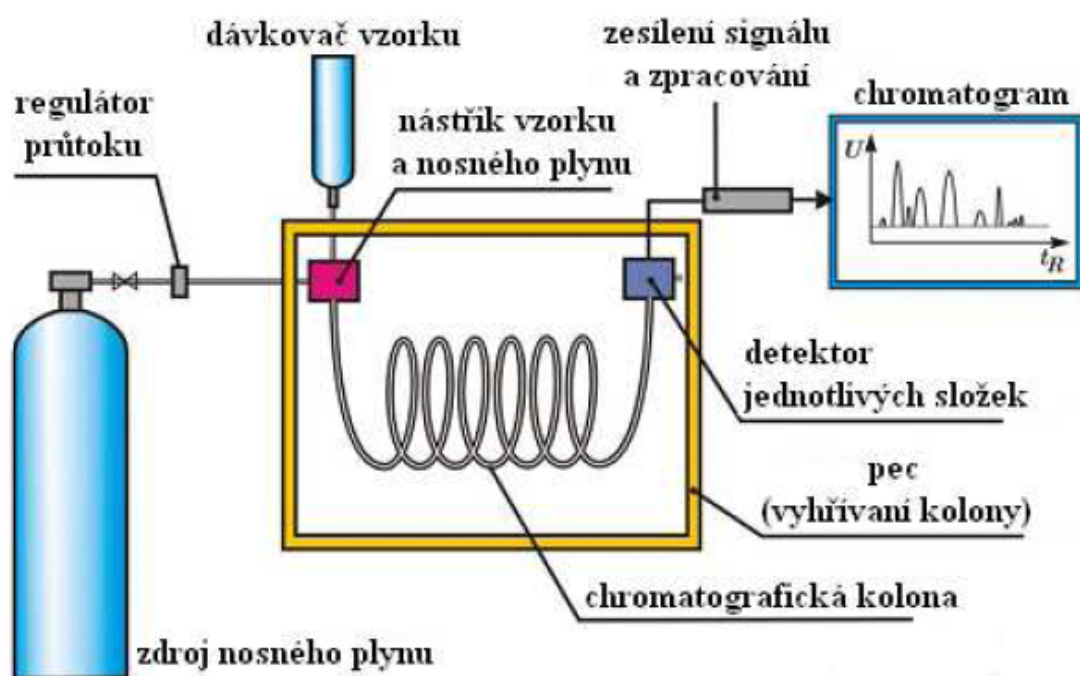
- Mobilní je ta fáze, která se v chromatografickém systému pohybuje v našem případě plyn (nosný plyn)
- Stacionární je v chromatografickém systému fáze nepohyblivá (pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce).

Plynový chromatograf se sestává z hlavních částí:

- Injektoru, který slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Nástřík se provádí speciální injekční stříkačkou. Plynný vzorek je z nástřikového portu zaveden do proudu nosného plynu a ten je pak transportován přes kolonu.
- Elektronického regulačního zařízení, které slouží k regulaci průtoku a tlaku nosného plynu.
- Zásobníku nosného plynu což je mobilní fáze (nejčastěji se používá vodík, dusík, helium a argon).
- Termostat slouží k vyhřívání kolony.
- Kolona což je ocelová, skleněná, nebo křemenná trubice, v níž dochází k separaci plyné směsi.
- Detektor zaznamenává vyplavování látek už rozseparované směsi. Existuje více typů detektorů, které se liší principem funkce, selektivitou, citlivostí, mezí detekce, konstrukcí. Vyjadřuje se v gramech na mililitr nosného plynu. Důležitý detektor, který je hodně univerzální a s dobrou citlivostí i mezí detekce, je plamenový ionizační detektor FID (Flame ionization detector). [34] [35]

Z tlakové láhve je odebrán nosný plyn. Ten, po průchodu, regulátory tlaku a průtoku přejde do nástřikové komory (injektoru). Injektor je vyhřát na teplotu, aby v něm došlo k okamžitému zplynění vzorku. Do vyhřátého injektoru se nadávkuje malé množství vzorku (1-10 μ l). Poté jsou z injektoru páry vzorku vedeny nosným plynem přes kolonu. V koloně se separují látky směsi. Jako první vychází látky, které jsou nejslaběji

zadržovány stacionární fází. Poslední vychází látky, které jsou v koloně zadržovány nejsilněji. Látky vystupují z kolony a přechází do detektoru. Detektor vydává elektrický signál vyhodnocovacímu zařízení, které informace následně zpracuje. Finální výstup z chromatografu je chromatogram.[34]



Obrázek 14: Zjednodušené schéma Chromatografu [5]

8. Experimentální část

8.1 Odběr vzorků a příprava vodného výluhu

Odběr vzorků půdy v lokalitě Lahos Hulváky byl proveden na základě zákona 185/2001 Sb., o odpadech. Odběr vzorků byl proveden standardními metodami, které jsou stanoveny technickou normou ČSN 465331 Ochrana přírody. Vzorky kontaminované půdy (2 x cca 3kg) byly odebrány z hloubky 20 cm, a to ze dvou míst. Odebraná půda byla převezena ve dvou plastových pytlích do laboratoře VŠB-TU Ostrava institutu environmentálního inženýrství. Z obou vzorků byl proveden ještě týž den vodný výluh (dle zákona o odpadech). Na obrázcích lze vidět druhé odběrové místo (viz obr. 15) a vzorek odebrané půdy (viz obr. 16).



Obrázek 15: Odběrové místo vzorku V2 [1]



Obrázek 16: Odebraný vzorek půdy V2 [1]

8.2 Příprava vodného výluhu

Vodným výluhem se stanovuje množství látek uvolněných z pevné fáze do kapalné (dle zákona o odpadech 185/2001 Sb.). Lze z něho analyzovat jak organické tak anorganické sloučeniny. Příprava vodného výluhu sestává ze tří částí, které byly prováděny postupně.

8.2.1 Stanovení množství sušiny

Prvním krokem při rozboru složení vzorku kontaminované půdy se zjišťuje podíl sušiny v zkoumaném vzorku (dle normy ČSN ISO 11465).

Pomůcky:

půdní vzorek, váhy, lopatka, hodinové sklíčko, gumové rukavice, sušicí pec.

Postup práce:

Bylo naváženo (2x100g) půdy na hodinová sklíčka z každého vzorku. Sušicí pec byla rozehráta na požadovanou teplotu 105 ± 5 °C. Po dosažení dané teploty byly do pece vloženy připravené vzorky půdy. V peci byly sušeny po dobu 1,5 hod. Po vychladnutí byly zváženy na laboratorních váhách. Tím byl zjištěn úbytek vody ze vzorků. Pro získání jistoty úplného vysušení byly vzorky vloženy opět do pece a sušeny další půl hodinu. Po vytažení a vychlazení byly zváženy, a protože dosáhly stejných hodnot jako při prvním pokusu, staly se podkladem pro výpočet podílu sušiny (viz. rovnice 1)

(1)

$$DR = 100 \cdot \frac{M_D}{M_W} [\%]$$

DR podíl sušiny v analytickém vzorku v [%],

M_D hmotnost vysušeného analytického vzorku v [kg],

M_W navážka analytického vzorku odpadu pro stanovení podílu sušiny v [kg] [36].

Výsledkem této první operace bylo stanovení množství sušiny a úbytek vody ve vzorcích (viz tab.1)

8.2.2 Výpočet množství kontaminované půdy k provedení výluhu

Pro další zkoumání byla vypočtena hmotnost analytického vzorku půdy pro přípravu vodného výluhu (viz rovnice č. 2).

Pomůcky:

Vzorky půdy, kádinka, lopatka, váhy, síto 6 mm.

Postup práce:

Do rovnice byly dosazeny získané hodnoty sušiny (DR) a pomocí teoretické navážky (M_T) byla vypočtena hmotnost (M) (viz. tab. 1) vzorků určených k vodnému výluhu. Vzorky půdy musí mít velikost zrn frakce 4 mm, a proto byly přesítovány.

(2)

$$M = 100 \cdot \frac{M_T}{DR} \text{ [kg]}$$

M hmotnost analytického vzorku odpadu pro přípravu vodného výluhu v [kg],

M_T ...teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg] (1 l vody je $M_T = 0,100$ kg)

DR....podíl sušiny v analytickém vzorku v [%] [36].

Druhou operací byly získány přesné hodnoty váhy vzorků určených k výluhu.

8.2.3 Výpočet množství vody pro přípravu výluhem

Níže uvedená rovnice byla použita pro výpočet množství vody pro zhotovení vodného výluhu.

Pomůcky:

Kádinky, destilovaná voda, odměrný válec.

Postup práce:

Do rovnice (viz. rovnice 3) byly dosazeny následující hodnoty: teoretická navážka sušiny (M_T), podíl sušiny DR a hustota vody. Výpočet (viz tab.1) byl použit pro stanovení vzorků určených ke konečné fázi - vodnému výluhu

(3)

$$L_A = M_T \frac{11 - 100 / DR}{\rho_{H_2O}} [l]$$

L_A množství přidané vody v [l],

M_T teoretická navážka sušiny analytického vzorku v [kg]

DR podíl sušiny v analytickém vzorku v [%]

ρ_{H_2O} hustota vody (pro účely stanovení vyluhovatelnosti je rovna 1 kg/l) [36].

Tímto třetím krokem byla dokončena příprava vzorků pro vodný výluh.

8.3 Práce s vodným výluhem obou vzorků

Pomocí výsledků vodného výluhu obou vzorků budou zjištěny druhy polutantů včetně jejich koncentrace.

Pomůcky:

Destilovaná voda, vzorky půdy, váhy, odměrný válec, láhve, třepačka, lopatka

Postup práce:

Oba dva vzorky byly po navážení vsypány do samostatných láhví. Do obou bylo dodáno vypočtené množství destilované vody. Obě dvě láhve byly vloženy do třepačky na dobu 24 hodin při rychlosti 70t/min.

Po 24 hodinách byl výluh přefiltrován. Přefiltrovaný výluh byl nalit do vzorkovnic a dodán k analýze do laboratoře VŠB-TU Ostrava na institutu environmentálního inženýrství.

Tab. 1 Hodnoty pro přípravu vodného výluhu.

Č. vzorku	M_w	M_D	DR	M_T	M	L_A
	[g]	[g]	[%]	[g]	[g]	[ml]
Vzorek 1	50,03	47,74	95,42	100	105	995
Vzorek 2	50,06	46,27	92,43	100	108	992

Výsledky analýzy výluhu obou vzorků nebylo možno dát k analýze organických látek na chromatogramu s hmotnostním spektrometrem (technické důvody), a proto byla nejprve provedena analýza na vybrané anorganické látky.

Na obrázcích lze vidět postup vytváření vodného výluhu (viz. obr. 17) a přístroj na třepání výluhu (viz. obr. 18)



Obrázek 17: Příprav vzorku vodného výluhu [1]



Obrázek 18: Třepačka Heidolph REAX 20 [1]

8.4 Analýza anorganických látek

Vybrané anorganické látky (železo, kadmium, zinek, olovo) patří k polutantům nevíce se vyskytujícím v půdě.

Pomůcky:

Vzorkovnice s vodným výluhem.

Postup:

Dvě vzorkovnice byly naplněny 50ml vodného výluhu a dodány k analýze do laboratoře CPIT. Analýza byla provedena na atomovém absorpčním spektrometru (AAS) (viz. kapitola 7.1.)

Tab. 2 Analýza anorganických látek a třídy vyluhovatelnosti

Č. vzorku	Fe [mg/l]	Zn [mg/l]	Pb [mg/l]	Cd [mg/l]
Vzorek 1	0,288	7,12	0,011	<0,002
Vzorek 2	0,692	0,04	0,017	<0,002
Třída vyluhovatelnosti dle vyhlášky č. 294/2005 Sb.				
I	-	0,4	0,05	0,004
IIa	-	20	5	0,5
IIb	-	5	1	0,1
III	-	20	5	0,5

Z výsledků hodnot analýzy anorganických látek porovnaných s limity stanovenými v Zákonu o odpadech 185/2001 Sb. , vyhl.č. 294/2005 Sb. (viz tab.2) Je zřejmé, že zkoumané vzorky lze zařadit do první třídy vyluhovatelnosti [37].

Vzorek z druhého odběrového místa má vyšších koncentrací hodnot vybraných anorganických prvků. Proto byl použit k dalším laboratorním pokusům.

8.5. Biodegradace organických látek ve výluhu

Zjištěním, že druhý vzorek vodného výluhu z půdy prokazuje větší hodnoty koncentrací zkoumaných anorganických prvků u většiny prvků, bylo pokračováno v dalším pokusu, a to formou biodegradace – loužení. Opět byl připraven vodný výluh (viz. předchozí kapitola 7.2.), který byl použit k bakteriálnímu loužení.

Pomůcky:

Enlenmayerovy baňky, výluh ze vzorku půdy, bakteriální inokulum, alobal

Postup práce:

Provedl se vodný výluh z půdy (viz kapitola 8.2 a 8.3).

Vodný výluh byl rozlit (400 ml) do baňek. Jedna baňka byla s čistým výluhem a do druhé bylo přidáno bakteriální inokulum (50 ml). Po dobu 46 dní se oba vzorky nechaly loužit. Loužení probíhalo za statických podmínek a občasného zamíchání (3týdně) při 26 °C. Bakteriální loužení probíhalo od 4.2. 2011 do 22.3. 2011 v laboratoři VŠB-TU Ostrava na institutu environmentálního inženýrství. Během této doby docházelo k průběžnému odebírání vzorků (cca 1x 14dní), které sloužily pro další analýzy.

Na obrázcích vidíme vodný výluh s inokulem (Obr. 19) a odebrané vzorky z výluhů (Obr. 20)



Obrázek 19: Vodný výluh s inokulem [1]



Obrázek 20: Odebrané vzorky z výluhu [1]

8.5.1 Analýza TOC a DOC

Stanovení rozpuštěného a celkového organického uhlíku ve výluhu.

Pomůcky:

Vzorkovnice, filtrační papír, nálevka

Postup práce:

První odběr vzorku byl proveden 4.2. 2011. Z každé baňky (výluh čistý a výluh s inokulem) byl přefiltrován (50ml vzorku) do vzorkovnice. Vzorkovnice byly odneseny do laboratoře VŠB- TU Ostrava na institutu environmentálního inženýrství na analýzu TOC (viz kapitola 7.2) a DOC.

Tab. 3 Hodnoty z analýzy TOC, DOC

Č. vzorku	TOC	TNb	DOC	TNb
	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
V1 čistý	63,20	1,73	58,55	2,18
V2 s bakteriemi	129,88	2,56	125,51	3,95

Ze získaných hodnot (viz. tab.3) je patrné, že hodnoty vzorku s inokulem jsou podstatně navýšeny oproti čistému vodnému výluhu z půdy. Podle třídy vyluhovatelnosti vyhlášky č. 294/2004 Sb. hodnota DOC ve vzorku s bakteriálním inokulem překročila třetí třídu vyluhovatelnosti.

8.6. Plynová chromatografie

Jedná se o separační a současně fyzikálně chemickou metodu pro oddělení a analýzu směsí látek. Základním principem této metody je rozdělování složek směsi na mobilní a stacionární. [34]

8.6.1. Plynová chromatografie s FID.

Pomůcky: vzorkovnice, zkumavky, mechanická třepačka, lahvičky se septem potaženým PTFE na 2ml, mikrostříkačky, dělicí nálevky

Postup práce:

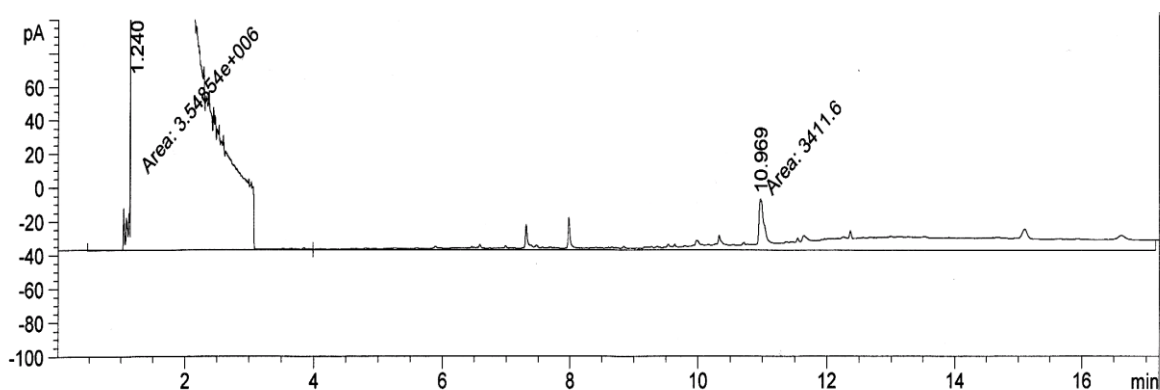
Z baňky (čistý výluh) byl odebrán vzorek 4.2.2011. Vzorek (výluh s inokulem) byl odebrán 22.3. 2011. Oba tyto vzorky byly přefiltrovány do vzorkovnice (50ml) a odneseny do laboratoře nanotechnologií při VŠB- TU Ostrava.

V laboratoři byl připraven extrakt z obou vzorků.

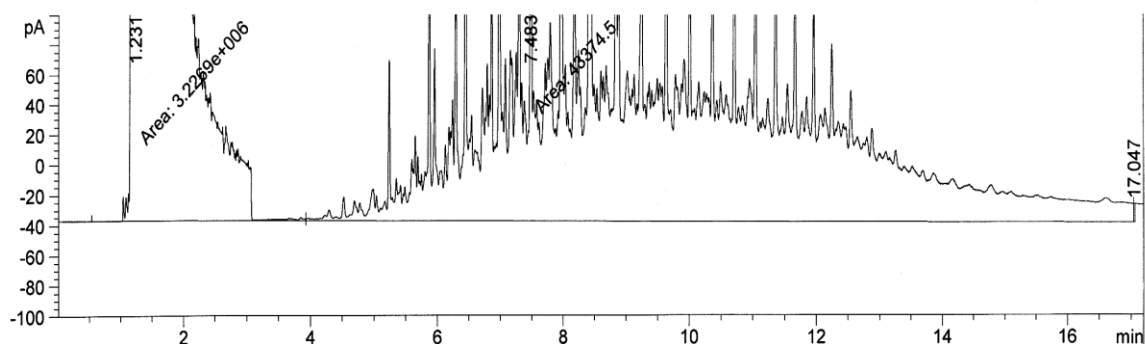
Příprava extraktu – 42ml čistého výluhu prvního vzorku bylo nalito do dělicí nálevky, do níž se přidaly 2ml CH_2Cl_2 (dichlormethan) a provedlo se ruční třepání vzorku. Po vytvoření emulze byla odebrána organická fáze do zkumavky (celý proces byl 2x opakován). Totéž se provedlo u vzorku číslo dvě (výluh s bakteriálním inokulem).

Poté bylo do obou vzorku přidáno extrakční činidlo (síran sodný Na_2SO_4) a obě zkumavky byly vloženy na mechanickou třepačku. Tímto krokem byla odstraněna voda ze zkumavky. Po vyjmutí obou zkumavek, bylo patrné, že se uvnitř vytvořili dvě fáze (kapalná a emulze). Injekční stříkačkou se odebrala kapalná fáze z každé zkumavky (tento postup se opakoval 3x).

Kapalná emulze ve zkumavce každého vzorku byla vložena do odfoukávacího zařízení (odfoukávání dusíkem). Následně po odfoukání, byl odebrán extrakt do lahvičky se septem, který se následně dal na plynovou chromatografickou analýzu (viz. kapitola 7.4)



Graf 1: Chromatogram čistého výluhu z půdy



Graf 2: Chromatogram výluhu s inokulem

Na ose x chromatogram je zaznamenán retenční čas (čas dané sloučeniny strávené v koloně), který určuje druh sloučeniny, která se ve vzorku vyskytuje. Hodnoty na ose y udávají, jaké množství dané látky se ve vzorku nachází.

Z toho je patrné, že v základním výluhu se vyskytuje 3 sloučenin vyšší koncentrace (viz. graf 1).

U vzorku s přidáním bakteriálního inokula (viz. graf 2) došlo k razantnímu navýšení a rozmanitosti organických sloučenin. I po 46 denním bakteriálním loužení. Pravděpodobně se jedná o aromatické alicyklické sloučeniny.

9. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověření možností použití ropných bakterií Korňa při biodegradaci organických látek z výluhu půdy oblasti Lahos.

Provedeno bylo několik analýz na vybrané látky ve vodném výluhu a biodegradace vybraných vzorků.

Z vodného výluhu byly provedena analýza anorganických látek (Zn, Cd, Fe, Pb). Podle vyhlášky ministerstva životního prostředí 294/2005 Sb. bylo patné, že všechny spadají do první třídy vyluhovatelnosti.

Po 46 dnech bakteriálního loužení byla u vzorku V1_(vodný výluh) a V2_(výluh s přidáním inokula bakteriemi) provedena analýza na obsah TOC, DOC a analýza na plynové chromatografii.

U vzorku výluhu po přidání inokula s bakteriemi spolu s ropnými látkami se nám razantně zvýšil obsah organických látek ve výluhu. Z chromatografu je patné, že se jedná o homologickou řadu uhlovodíku C10-C40, které se liší délkou uhlíkového řetězce. U stanovení TOC a DOC lze vidět, že také vzorek s inokulem má výrazně vyšší hodnoty než vzorek s čistým výluhem.

Výsledky v této diplomové práci nevyšly podle očekávání. Na základě poznatků a zkušeností by bylo vhodnější v rámci dalších diplomových prací zvolit jiný postup metodiky.

Z ropného pramene by měly být izolovány čisté kultury jednotlivých kmenů bakterií a následně aplikovány přímo do kontaminované půdy oblasti Lahos Hulváky. Po nějaké časovém intervalu biodegradace by byly odebrány vzorky pro vodný výluh a dán na analýzu.

10. Použitá literatura

1. BŘEZINA, Vlastimil, et al. *Sedmdesát let národního podniku Urxovy závody v Ostravě*. Olomouc : Moravské tiskařské závody, 1962. 115 s.
2. KUBÁTOVÁ, Zuzana . Zamořená půda ohrožuje pitnou vodu. *IDnes.cz* [online]. 3.7. 2004, [cit. 2011-04-24]. Dostupný z WWW: <http://zpravy.idnes.cz/zamorena-puda-ohrozuje-pitnou-vodu-d6t-/domaci.asp?c=A040603_072710_domaci_ton>.
3. RACLAVSKÁ, Helena . *Znečištění zemin a metody jejich dekontaminace*. Ostrava : VŠB-Technická univerzita Ostrava, 1998. 116 s. ISBN 80-7078-508-X.
4. *B-A-K.PDF* [online]. 2006 [cit. 2011-04-29]. *Fle.czu.cz*. Dostupné z WWW: <<http://fle.czu.cz/~landa/SLOVNIKY/EKO/B/B-A-K.PDF>>.
5. *Trojmedzie.sk* [online]. 2011 [cit. 2011-04-29]. Korňanský ropný prameň a Kamenné gule - prírodné pamiatky svetového významu . Dostupné z WWW: <<http://trojmedzie.sk/index.php/pozrite-sa-na-/144-koransky-ropny-prame-a-kammenne-gule-prirodne-pamiatky-svetoveho-vyznamu>>.
6. ŠIMEK, Miloslav. *Základy nauky o půdě - 4. Degradace půdy*. České Budějovice : Vlastimil Johanus TISKÁRNA, 2004. 225 s. ISBN 80-7040-667-4
7. *Okd.cz* [online]. 2010 [cit. 2011-04-07]. Jak uhlí vzniklo. Dostupné z WWW: <<http://www.okd.cz/cz/tezime-uhli/jak-uhli-vzniklo/>>.
8. Blažek J., Rábl V.: *Základy zpracování a využití ropy*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. ISBN 80-7080-619-2
9. *Zemníplyn.cz* [online]. 2010 [cit. 2011-04-07]. Co je zemní plyn. Dostupné z WWW: <<http://www.zemniplyn.cz/plyn/#vlastnosti>>.
10. TICHÝ, Miloň. *Toxikologie pro chemiky*. Praha : Karolinum, 1998. 90 s. ISBN 80-7184-625-2.

11. KÁŠ, Jan, et al. *Biochemie životního prostředí*. Praha: MBÚ AV ČR, 1996. 119 s.
12. ŘÍHA, Milan. Toxicita ropy a ropných produktů. *Časopis 112* [online]. 2006, 3, [cit. 2011-04-29]. Dostupný z WWW: <<http://www.trivis.info/view.php?cisloclanku=2006032401>>.
13. *Irz.cenia.cz* [online]. 2011 [cit. 2011-04-07]. Methan. Dostupné z WWW: <<http://www.irz.cz/irz/new/node/68>>.
14. *Irz.cz* [online]. 2011 [cit. 2011-04-07]. Benzen. Dostupné z WWW: <<http://www.irz.cz/repository/latky/benzen.pdf>>.
15. CHATZIS, C. – ALEXOPOULOS, E.C. – LINOS, A. Indoor and outdoor personal exposure to benzene in Athens, Greece. *Sci. Total Environ.* 2005, vol. 349, p. 72-80.
16. *Irz.cenia.cz* [online]. 2011 [cit. 2011-04-07]. Toluen. Dostupné z WWW: <<http://www.irz.cz/irz/new/node/95>>.
17. *Irz.cenia.cz* [online]. 2011 [cit. 2011-04-07]. Xylen. Dostupné z WWW: <<http://www.irz.cz/irz/new/node/105>>.
18. *Irz.cenia.cz* [online]. 2011 [cit. 2011-04-07]. Styren. Dostupné z WWW: <<http://www.irz.cz/irz/new/node/91>>.
19. ZÁTOPKOVÁ, Daniela. *Stanovení těžkých polyaromátů v odpadních vodách závodu Deza*. Brno, 2009. 89 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
20. *Irz.cz* [online]. 2007 [cit. 2011-04-30]. Fenoly. Dostupné z WWW: <<http://www.irz.cz/repository/latky/fenoly.pdf>>.
21. *Irz.cenia.cz* [online]. 2011 [cit. 2011-04-07]. PCB. Dostupné z WWW: <<http://www.irz.cz/irz/new/node/87>>.
22. *Eso.vscht.cz* [online]. 2004 [cit. 2011-04-30]. Biodegbiodet.pdf. Dostupné z WWW: <http://eso.vscht.cz/cache_data/1175/www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/biodegbiodet.pdf>.

23. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2008. 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
24. LANDA, Ivan. *Fle.czu.cz* [online]. 2008 [cit. 2011-04-30]. G040-METODY-BIOLOGICKE.PDF . Dostupné z WWW: <<http://fle.czu.cz/~landa/UCTEXT/G/G040-METODY-BIOLOGICKE.PDF>>.
25. ČEJKOVÁ, Alena. *Vscht.cz* [online]. 2010 [cit. 2011-04-30]. Bam-mag.pdf. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/bam-mag.pdf>>.
26. MALINOVSKÁ, Lenka. *Význam lektinů patogenních mikroorganismů se zaměřením na rod Candida : Průkaz a charakteristika lektinů Candida albicans*. Brno, 2006. 75 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita.
27. LYČKOVÁ, Gabriela , et al. BIODEGRADATION OF PAHS, PCBS AND PHC IN SEDIMENTS FROM ČERNÝ PŘÍKOP (CZECH REPUBLIC). *GeoScience Engineering*. 2007, no.2, s. 1-15. ISSN 1802-5420.
28. KOHUTOVÁ, Hana. *Selektivní odstraňování Cu z odpadních vod obsahujících fosfáty pomocí oxyhumolitu* [online]. Ostrava : Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2010. 57 s. Diplomová práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Dostupné z WWW: <http://dspace.vsb.cz/bitstream/10084/81919/1/KOH141_FMMI_N3923_3911T033_2010.pdf>.
29. *Laboratoře geologických ústavů Přírodovědecké fakulty UK v Praze* [online]. 2009 [cit. 2011-04-07]. Laboratoř plamenové atomové absorpční spektrometrie. Dostupné z WWW: <<http://www.natur.cuni.cz/geologie/laboratore/laboratore-a-metody/laborator-plamenove-atomove-absorpcni-spektrometrie-faas>>.
30. *Centrum nanotechnologií Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava* [online]. 2004 [cit. 2011-04-07]. Oddělení anorganické analýzy. Dostupné z WWW: <<http://www.vsb.cz/9360/cs/okruhy/oddeleni/oddeleni-anorganicke-analyzy/>>.

- 31.** SCHUMACHER, Brian A. *Epa.gov* [online]. 2008 [cit. 2011-04-30]. METHODS FOR THE DETERMINATION OF TOTAL ORGANIC CARBON (TOC) IN SOILS AND SEDIMENTS. Dostupné z WWW: <<http://www.epa.gov/esd/cmb/research/papers/bs116.pdf>>.
- 32.** *Teledynetekmar.com* [online]. 2011 [cit. 2011-04-30]. Apollo 9000 Combustion TOC/TN Analyzer. Dostupné z WWW: <<http://www.teledynetekmar.com/products/TOC/Apollo/>>.
- 33.** *Podklady pro Ministerstvo životního prostředí k provádění Protokolu o PRTR - prehled metod merení a identifikace látek sledovaných podle Protokolu o registrech úniku a prenosu znečišťujících látek v únicích do vody.*, Praha : MŽP, 2007. 3 s. Dostupné z WWW: <http://www.irz.cz/dokumenty/irz/metody_mereni/voda/celkovy_dusk.pdf>.
- 34.** *Hgf.vsb.cz* [online]. 2010 [cit. 2011-04-30]. Návod y k praktikum. Dostupné z WWW: <http://www.hgf.vsb.cz/miranda2/export/sites-root/hgf/instituty-a-pracoviste/cs/okruhy/546/studijni-materialy/Navody_k_praktiku.pdf>.
- 35.** *Cheminfo.chemi.muni.cz* [online]. 2007 [cit. 2011-04-30]. úvod. Dostupné z WWW: <http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf>.
- 36.** *Http://www.eurochem.cz/ : METODICKÉ POKYNY* [online]. Ministerstvo životního prostředí : 2011 [cit. 2011-04-30]. Dostupné z WWW: <http://www.eurochem.cz/files/texts/MP_vyluhovatelnost_%20odpadu.pdf?PHPSESSID=259...>
- 37.** ŘÍMANOVÁ, Dana. *Zákon o odpadech č.2001 Sb. včetně prováděcích oředpisů a komentářů*. Praha : Polygon, 2001. 444 s.

11. Seznam obrázků

Obrázek 1: Bakterie z ropného pramene Korňa [1] (vlastní foto), str. [2]

Obrázek 2: Dubova destilace surového benzolu z roku 1955 [2]

(BŘEZINA, Vlastimil, et al.), str. [4]

Obrázek 3: Korňanský ropný pramen [3] (foto.mapy.cz), str. [6]

Obrázek 4: Struktura molekuly Methanu [4] (www. google.com), str. [9]

Obrázek 5: Struktura molekuly Benzenu [4] (www. google.com), str. [10]

Obrázek 6: Struktura molekuly Toluenu [4] (www. google.com), str. [11]

Obrázek 7: Struktura molekuly xylenu [4] (www. google.com), str. [11]

Obrázek 8: Struktura molekuly styrenu [4] (www. google.com), str. [12]

Obrázek 9: Struktura molekuly PAU [4] (www. google.com), str. [13]

Obrázek 10: Struktura molekuly fenolu [4] (www. google.com), str. [14]

Obrázek 11: Struktura molekuly PCB [4] (www. google.com), str. [15]

Obrázek 12: Pseudomonas [4] (www. google.com), str. [20]

Obrázek 13: Rhodococcus [4] (www. google.com), str. [20]

Obrázek 14: Zjednodušené schéma chromatografu [5] (www.hgf.vsb.cz), str. [25]

Obrázek 15: Odběrové místo vzorku V2 [1] (vlastní foto), str. [26]

Obrázek 16: Vzorek odebrané půdy V2 [1] (vlastní foto), str. [26]

Obrázek 17: Postup přípravy vzorků [1] (vlastní foto), str. [30]

Obrázek 18: Třepačka Heidolph REAX 20 [1] (vlastní foto), str. [30]

Obrázek 19: Vodný výluh s inokulem [1] (vlastní foto), str. [32]

Obrázek 20: Odebrané vzorky [1] (vlastní foto), str. [32]

12. Seznam tabulek

Tabulka 1: Hodnoty pro přípravu vodného výluhu, str. [30]

Tabulka 2: Analýza anorganických látek a třídy vychovatelnosti, str. [31]

Tabulka 3: Hodnota z analýzy TOC, DOC, str. [33]

13. Seznam grafů

Graf 1: Chromatogram čistého výluhu z půdy, str. [34]

Graf 2: Výluh s inokulem, str. [35]